

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ubi jalar ungu yang diperoleh dari petani ubi jalar ungu di Ngawi Jawa Timur.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ubi jalar ungu yang diambil dari populasi secara acak di petani ubi jalar ungu daerah Ngawi Jawa Timur dengan memilih daun yang segar, bebas dari hama, berwarna hijau.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air daun ubi jalar ungu (*Ipomea batatas* L). Variabel utama yang kedua adalah aktivitas penurunan kadar trigliserida dengan metode GPO-PAP. Variabel utama yang ketiga adalah tikus putih jantan galur wistar dengan berat badan 180-200 gram.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari daun ubi jalar ungu (*Ipomea batatas* L).

Variabel tergantung adalah pusat permasalahan yang merupakan kriteria dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah penurunan kadar trigliserida dalam serum darah tikus putih jantan galur wistar setelah diberi

perlakuan dengan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari daun ubi jalar ungu.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah peneliti, kondisi fisik hewan uji meliputi berat badan, usis, jenis kelamin, galur, lingkungan tempat tinggal dan laboratorium, metode uji, ekstraksi, fraksinasi.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun ubi jalar ungu diperoleh dari petani ubi jalar ungu di wilayah Ngawi, Jawa Timur.

Kedua, serbuk daun ubi jalar ungu adalah serbuk yang berasal dari daun ubi jalar ungu yang telah dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C, digiling dan diayak menggunakan ayakan mesh 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun ubi jalar ungu adalah hasil ekstraksi serbuk daun ubi jalar ungu dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode maserasi.

Keempat, fraksi *n*-heksan adalah ekstrak kental daun ubi jalar ungu yang dipartisi dengan *n*-heksan dan air.

Kelima, fraksi etil asetat adalah residu fraksi *n*-heksan yang kemudian dipartisi dengan etil asetat.

Keenam, fraksi air adalah residu sisa partisi dengan etil asetat.

Ketujuh, hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar usia 2-3 bulan dengan berat badan 180-200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kedelapan, induksi hipertrigliseridemia dalam penelitian ini adalah diet tinggi lemak dan propiltiourasil selama 21 hari.

Kesembilan, peningkatan kadar trigliserida hewan uji adalah selisih kadar trigliserida pada hari ke-0 sampai dengan hari ke-14.

Kesepuluh, penurunan kadar trigliserida hewan uji adalah selisih kadar trigliserida pada hari ke-7 dengan hari ke-14 setelah perlakuan.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak dan fraksi daun ubi jalar ungu dalam penelitian ini adalah pisau, oven, alat penggiling, ayakan mesh 40, botol maserasi, batang pengaduk, corong glass, kain flanel, kertas saring, *rotary evaporator*, beker glass *pyrex*, erlenmeyer *pyrex*, gelas ukur *pyrex*, corong pisah, *moisture balance*, *Sterling Bidwell*, timbangan analitik AEG-120 *Shimadzu*, spektrofotometer *rayto*, *centrifuge* tipe t121, tabung serologi, mortir dan stamfer, jarum suntik oral, pipa kapiler, tabung reaksi *pyrex*, kandang tikus.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan adalah daun ubi jalar ungu (*Ipomea batatas* L.) yang diperoleh dari petani ubi jalar ungu di Ngawi, Jawa Timur.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan yaitu etanol 70%, *n*-heksana, etil asetat dan air sebagai cairan penyari. Identifikasi kandungan kimia daun ubi jalar ungu menggunakan HCl pekat, serbuk Mg, amil alkohol, larutan besi (III) klorida, kloroform, H₂SO₄ dan HCl. Pengujian KLT menggunakan Liebermann Burchard, *n*-butanol, asam asetat, metanol. Uji farmakologis yaitu larutan kit Diasys trigliserida FS (4-Chlorophenol dan 4-Aminoantipyrine), gemfibrozil, CMC Na dan aquadest.

3. Hewan percobaan

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar usia 2-3 bulan dengan berat badan 180-200 gram sebanyak 30 ekor yang diberi pakan diet tinggi lemak. Tikus diperoleh dari Labotaorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman digunakan untuk menentukan kebenaran daun ubi jalar ungu berdasarkan ciri-ciri makroskopis dan morfologis dari tanaman yang

akan diteliti dengan kunci determinasi. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Morfologi Sistemik Tumbuhan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Daun ubi jalar ungu diambil dari petani ubi jalar ungu di Ngawi, Jawa Timur pada bulan Januari 2019 dalam keadaan segar dan tidak terkontaminasi penyakit.

3. Pembuatan serbuk

Daun ubi jalar ungu segar dicuci untuk menghilangkan kotoran dan debu yang melekat pada daun, kemudian daun ditiriskan dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama beberapa hari sampai kering. Simplisia yang sudah kering dihaluskan dengan menggunakan mesin penggiling, kemudian simplisia diayak menggunakan ayakan mesh 40.

4. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan simplisia daun ubi jalar ungu (*Ipomea batatas* L.) dalam penelitian ini menggunakan alat *Moisture balance*. Sebanyak 2 gram serbuk daun ubi jalar ungu dimasukkan ke dalam cakram yang sudah ditara. Wadah kemudian dimasukkan ke dalam alat *Moisture balance*. Alat *Moisture balance* akan berbunyi jika pengoperasian telah selesai. Hasil susut pengeringan dicatat (dalam satuan %) dan serbuk simplisia ditimbang sebanyak 3 kali (Depkes 2008).

5. Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dilakukan dengan metode maserasi dengan perbandingan 1:10. Serbuk daun ubi jalar ungu sebanyak 900 gram dimasukkan ke dalam botol berwarna coklat kemudian direndam dengan etanol 70% sebanyak 75 bagian yaitu 6750 ml, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya, dengan penggojokan setiap hari. Cairan hasil ekstraksi disaring dengan kain flanel dan kertas saring. Ampas kemudian dibilas kembali dengan etanol 70% secukupnya sampai diperoleh filtrat 100 bagian yaitu 9000 ml. Kemudian filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, hasilnya disebut ekstrak kental etanol daun ubi jalar ungu.

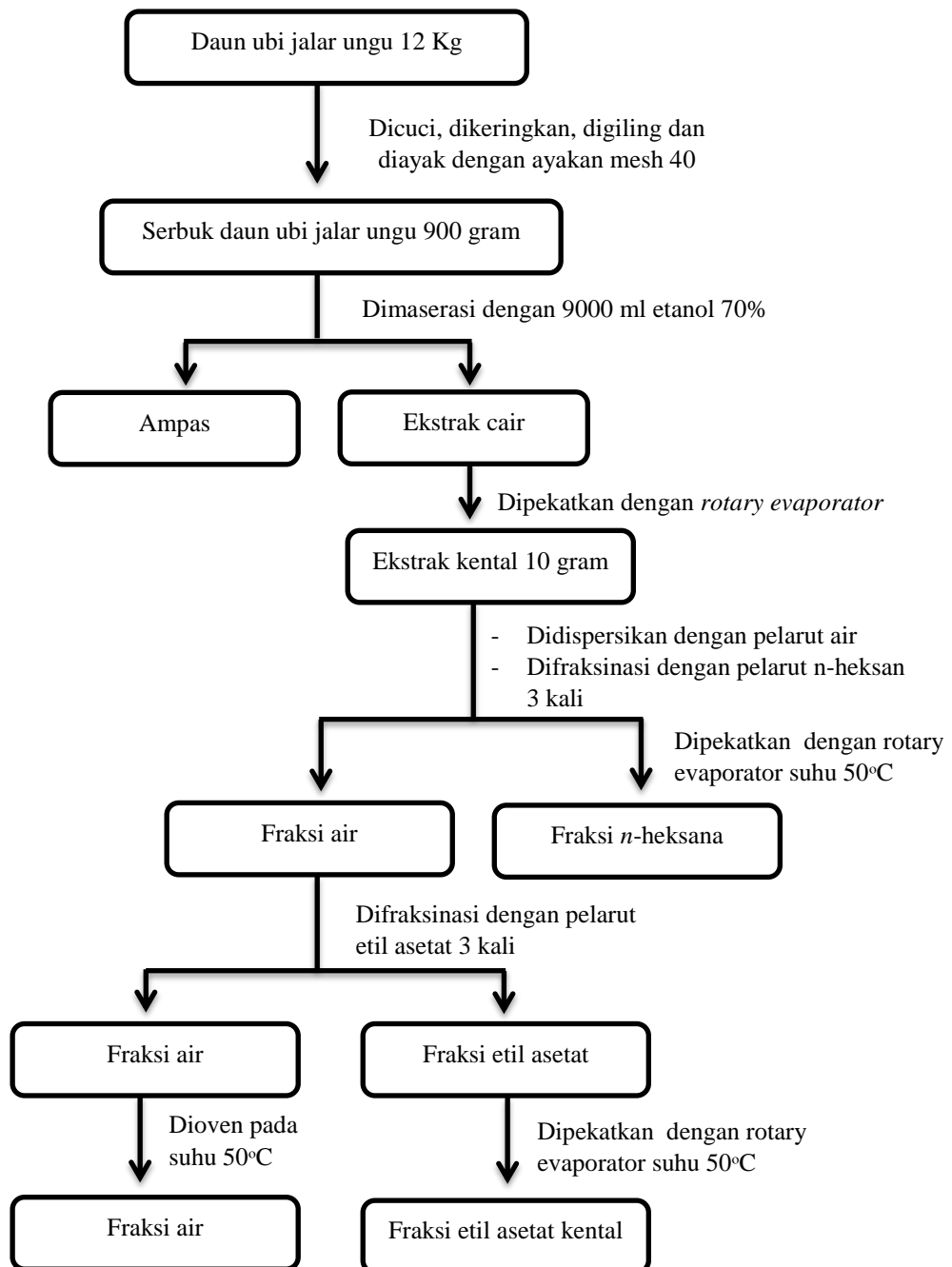
6. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak

Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun ubi jalar ungu dilakukan dengan alat *Sterling Bidwell*. Caranya dengan menimbang serbuk dan ekstrak daun ubi jalar ungu sebanyak 20 gram kemudian dimasukkan ke dalam labu alas bulat pada alat *Sterling Bidwell*, lalu ditambahkan toluen jenuh air sebanyak 200 ml dan dipanaskan sampai tidak ada air yang menetes lagi. Selanjutnya kadar air diukur dengan melihat volume skala pada alat dan dihitung % air dari berat sampel (Depkes 2008).

7. Pembuatan fraksi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu

Ekstrak etanol daun ubi jalar ungu ditambahkan air suling dengan perbandingan 1:7,5 (10 g : 75 ml) untuk melarutkan ekstrak, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan 75 ml *n*-heksana dan digojog hingga ekstrak berpartisi ke kedua lapisan penyari selama 15 menit. Corong pisah didiamkan hingga lapisan air dan lapisan *n*-heksana memisah. Lapisan bagian atas diambil sebagai fraksi *n*-heksana dan bagian bawah sebagai filtrat air. Dilakukan penyarian ulang terhadap lapisan air menggunakan *n*-heksana sebanyak dua kali 75 ml. Fraksi *n*-heksana dikumpulkan dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh fraksi *n*-heksana kental.

Lapisan air dimasukkan kembali ke dalam corong pisah kemudian ditambahkan 75 ml etil asetat dan digojog hingga ekstrak berpartisi ke kedua lapisan penyari selama 15 menit. Corong pisah didiamkan hingga lapisan air dan lapisan etil asetat memisah. Lapisan bagian atas diambil sebagai fraksi etil asetat dan lapisan bawah sebagai fraksi air. Fraksi etil asetat dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh fraksi etil asetat kental. Dilakukan penyarian ulang terhadap lapisan air menggunakan etil asetat sebanyak dua kali 75 ml. Lapisan air dipekatkan dengan oven pada suhu 50°C hingga diperoleh fraksi air kental. Skema proses pembuatan fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksinasi daun ubi jalar ungu.

8. Identifikasi senyawa kimia aktif ekstrak dan fraksi daun ubi jalar ungu

8.1 Identifikasi flavonoid. Sebanyak 0,1 gram serbuk dan ekstrak ditambah 5 ml aquadest, panaskan selama 5 menit, kemudian dikocok lalu disaring. Filtrat ditambahkan sedikit serbuk Mg, HCl pekat dan amil alkohol.

Hasil positif akan terbentuk warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Prameswari *et al.* 2014).

8.2 Identifikasi polifenol. Sebanyak 0,1 gram serbuk dan ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah 5 ml aquadest dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring dan filtrat yang didapat ditambahkan FeCl_3 1% 5 tetes. Hasil positif polifenol ditunjukkan dengan warna merah atau hijau kehitaman (Prameswari *et al.* 2014).

8.3 Identifikasi saponin. Sebanyak 0,5 gram serbuk dan ekstrak ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan dan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, kemudian akan terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N, buih tidak hilang maka positif mengandung saponin (Kenta *et al.* 2018).

Pengujian juga dilakukan dengan KLT (Ekowati dan Hanifah 2016) :

Fase diam : Silika gel GF 254
 Fase gerak : Kloroform-metanol-air (64:50:10)
 Penampak noda : UV 254 nm, UV 366 nm, anisaldehyd asam sulfat (dipanaskan suhu 100°C selama 5 menit), Liebermann Burchard (dipanaskan suhu 100°C selama 5 menit)
 Baku pembnding : saponin

Saponin dengan reagen anisaldehyd asam sulfat memberikan warna biru, biru violet atau kekuningan. Dengan reagen semprot Liebermann Burchard berwarna hijau atau biru untuk saponin steroid dan berwarna merah muda, merah, ungu atau violet untuk saponin triterpenoid.

8.4 Identifikasi tanin. Sebanyak 0,5 gram serbuk dan ekstrak ditambahkan 5 ml aquadest dididihkan selama 5 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 5 tetes larutan FeCl_3 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan warna hitam kebiruan atau hijau kebiruan (Prameswari *et al.* 2014).

Pengujian juga dilakukan dengan KLT (Hayati *et al.* 2010) :

Fase diam : Silika gel GF 254
 Fase gerak : n-butanol-asam asetat-air (4:1:5)

Penampak noda : UV 254 nm, UV 366 nm, FeCl₃

Baku pembandingan : asam galat

Hasil positif tanin akan memberikan warna hijau atau biru setelah disemprot pereaksi FeCl₃.

9. Pengujian aktifitas farmakologi

9.1 Pembuatan pakan tinggi lemak. Pakan tinggi lemak untuk hewan uji dibuat dengan mencampurkan kuning telur puyuh 50 gr, kuning telur bebek 50 gr dan pakan standar 800 gr kemudian dibuat pelet. Jumlah pakan harian baik pakan kolesterol maupun pakan standar yang diberikan adalah 20 gram/ekor/hari dan air minum yang diberikan secara *ad libitum* (Kenta *et al.* 2018), sedangkan minyak babi diberikan secara oral 1 ml/hari.

9.2 Larutan CMC Na 0,5%. Larutan CMC Na 0,5% dibuat dengan cara melarutkan 0,5 g CMC Na dalam aquades panas secukupnya sambil diaduk hingga terbentuk larutan koloidal. Setelah itu ditambahkan aquades hingga 100ml.

9.3 Suspensi propiltiourasil (PTU). Dosis propiltiourasil yang digunakan sebanyak 12,5 mg/hari dibagi dalam 2 kali dosis pemberian selama 14 hari. Dosis PTU dalam sekali pemberian yaitu $6,25 \text{ mg}/200 \text{ g BB} = 31,25 \text{ mg/Kg BB}$. Larutan stok PTU yaitu 0,25 %. Volume pemberian PTU yaitu 1 ml yang mengandung PTU dosis 6,25 mg.

9.4 Suspensi gemfibrozil. Dosis gemfibrozil ditentukan berdasarkan dosis manusia dengan berat badan 70 kg yaitu 600 mg yang diberikan 2 kali sehari. Konversi dosis yang digunakan adalah konversi dosis dari manusia ke tikus dengan berat badan 200 gram dengan nilai konversi yaitu 0,018. Dosis gemfibrozil untuk manusia adalah 600 mg, sehingga jika dikonversikan ke tikus yaitu $600 \text{ mg} \times 0,018 = 10,8 \text{ mg}/200 \text{ g} = 54 \text{ mg/Kg BB}$ tikus. Larutan stok gemfibrozil yaitu 0,432 %. Volume pemberian gemfibrozil yaitu 1 ml yang mengandung gemfibrozil dosis 10,8 mg.

9.5 Penetapan dosis ekstrak dan fraksi. Penetapan dosis sediaan uji dari ekstrak etanol daun ubi jalar ungu diberikan berdasarkan dosis efektif hasil penelitian dari Kenta *et al.* (2018) yang menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu pada dosis 300 mg/Kg BB tikus selama 14 hari dapat

menurunkan kadar kolesterol total darah. Dosis fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun ubi jalar ungu yang digunakan sesuai dengan rendemen yang didapat dan dihitung dengan cara :

$$DA = \frac{\text{Rendemen fraksi (\%)}}{\text{Total rendemen fraksi (\%)}} \times \text{Dosis ekstrak}$$

Keterangan : DA = Dosis fraksi A (*n*-heksana, etil asetat, air)

Banyaknya volume pemberian ekstrak dan fraksi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu yang digunakan dihitung berdasarkan berat badan dari masing-masing tikus, kemudian dilarutkan dengan larutan suspensi CMC Na 0,5% dan diberikan secara oral pada masing-masing tikus.

9.6 Perlakuan dan pengelompokan hewan uji. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) umur 2-3 bulan dengan berat badan 180-200 gram. Hewan uji sebelum dilakukan percobaan diadaptasi dengan pakan dan lingkungan laboratorium selama \pm 7 hari. Selanjutnya, tikus dipuasakan selama 18 jam sebelum diberi perlakuan dengan tetap diberikan air minum. Pengelompokan hewan uji dibagi secara acak menjadi 6 kelompok perlakuan yang terdiri dari 5 ekor tikus putih jantan galur wistar untuk masing-masing kelompok perlakuan dan dari masing-masing kelompok mendapatkan perlakuan yang berbeda-beda. Skema pengujian dapat dilihat pada gambar 4.

Pengelompokan hewan uji sebagai berikut :

Kelompok I merupakan kelompok kontrol hipertrigliserida, diberikan CMC Na 0,5%.

Kelompok II merupakan kelompok kontrol pembanding, diberikan suspensi gemfibrozil dengan dosis 54 mg/KgBB sebanyak 1 ml.

Kelompok III merupakan kelompok perlakuan I, diberikan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis 300 mg/KgBB sebanyak 1 ml.

Kelompok IV merupakan kelompok perlakuan II, diberikan fraksi *n*-heksan setara dengan dosis ekstrak daun ubi jalar ungu.

Kelompok V merupakan kelompok perlakuan III, diberikan fraksi etil asetat setara dengan dosis ekstrak daun ubi jalar ungu.

Kelompok VI merupakan kelompok perlakuan IV, diberikan fraksi air setara dengan dosis ekstrak daun ubi jalar ungu.

9.7 Pengukuran kadar trigliserida serum darah tikus. Pengukuran kadar trigliserida serum darah tikus dilakukan dengan menggunakan metode GPO-PAP dengan mengambil darah tikus lewat vena mata pada hari ke-0, hari ke-14, hari ke-21 dan hari ke-28. Pengukuran kadar trigliserida pada hari ke-0 bertujuan untuk mengetahui kadar awal trigliserida, pada hari ke-21 bertujuan untuk mengetahui kondisi hipertrigliserida setelah diberi pakan tinggi lemak dan induksi PTU. Pada hari ke-28 dan hari ke-35 bertujuan untuk mengetahui penurunan kadar trigliserida yang optimal setelah diberi perlakuan ekstrak dan fraksi daun ubi jalar ungu serta kontrol pembanding obat.

Prinsip kerja metode GPO-PAP yaitu trigliserida dihidrolisis dengan enzim lipoprotein lipase membentuk gliserol dan asam lemak bebas. Gliserol bereaksi dengan ATP dengan bantuan enzim gliserol kinase membentuk gliserol fosfat, selanjutnya oleh enzim gliserol fosfat oksidase diubah menjadi dihidroksiaseton fosfat dan hidrogen peroksidase. Hidrogen peroksidase berikatan dengan aminoantipiryn dan 4-klorophenol membentuk quinonimin yang berwarna dan dapat diukur absorbansinya.

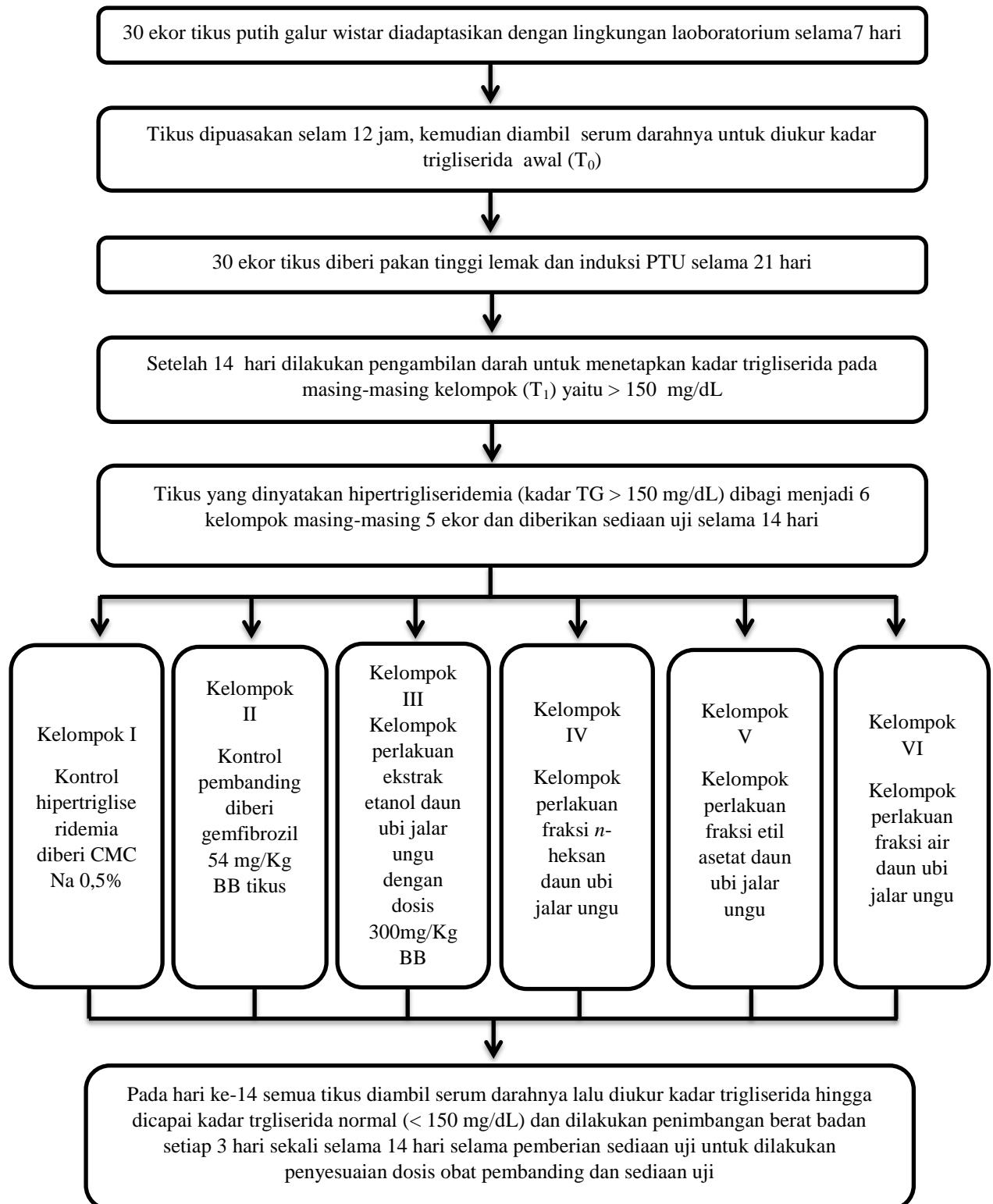
Darah diambil dari vena mata tikus putih jantan galur wistar sebanyak 1 ml kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit dan dipisahkan serumnya. Serum diambil sebanyak 10 μ L dan ditambah 1000 μ L pereaksi trigliserida yang kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 20-25°C, kemudian diamati serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm sehingga didapat kadar trigliserida serum darah tikus.

E. Analisis Hasil

Analisis data yang didapat pada penelitian ini merupakan data yang dianalisa secara statistik untuk mendapatkan dosis yang paling efektif dari ekstrak dan fraksi daun ubi jalar ungu sebagai antihipertrigliseridemia yaitu untuk menurunkan kadar trigliserida serum darah tikus menggunakan *software SPSS for Windows Release 21.0*. Pengolahan data dilakukan dengan melihat apakah data

tersebut terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan uji *Levene Statistic*. Data yang terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan homogen dilanjutkan dengan metode uji parametrik *one-way ANOVA* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan atau tidak diantara perlakuan, jika hasil uji terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji *Tukey Post Hoc Test*. Uji *Tukey Post Hoc Test* digunakan untuk melihat apakah ada perbedaan di antara masing-masing kelompok perlakuan. Data yang tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) dan homogen dilanjutkan dengan metode uji non parametrik dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*.

F. Skema Penelitian



Gambar 4. Skema pengujian kadar trigliserida.